

## 产品手册

### H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell Line

### H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

## 目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	产品描述.....	4
四、	材料准备.....	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	5
2.	试剂耗材准备.....	5
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	细胞复苏.....	6
2.	细胞传代（以 10 cm 皿为例）.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法（示例）.....	7
1.	激活验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
2.	抗体激动剂 Crosslink 验证实验.....	9
1)	加样步骤.....	10
2)	报告基因检测.....	11
3)	验证结果.....	11
附录 1	流式验证结果.....	12
附录 2	流式稳定性验证结果.....	12
附录 3	激活验证.....	13
相关产品	.....	14
使用许可协议:	.....	15

## 一、 产品基本信息及组分

### 基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C04832	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL

### 组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C04832	H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

## 二、 包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

### 三、 产品描述

4-1BB 又称为 CD137 或 TNFRSF9, 是一种可诱导的共刺激受体, 属于肿瘤坏死因子受体超家族的成员, 在 T 细胞, 自然杀伤(NK)细胞和先天免疫细胞中均有表达。4-1BB 与 4-1BB 配体(4-1BBL)的相互作用, 能够促进细胞增殖、存活和细胞因子产生。目前针对 4-1BB 的药物研发主要是用于治疗炎症或自身免疫病, 以及用于癌症治疗。靶向 4-1BB 的激动型抗体在治疗炎症或自身免疫病方面进展喜人, 靶向 4-1BB 和免疫检查点或共刺激靶点的联合疗法将发挥更强的抗肿瘤作用。

吉满生物 H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 报告基因细胞系, 是基于 4-1BBL/4-1BB 构建的一种 Luciferase 报告基因细胞系。该细胞稳定表达 4-1BB 基因及 Luciferase 报告基因, 可用于靶向 4-1BB 的单抗或双抗等治疗性抗体的体外激活效果评价。

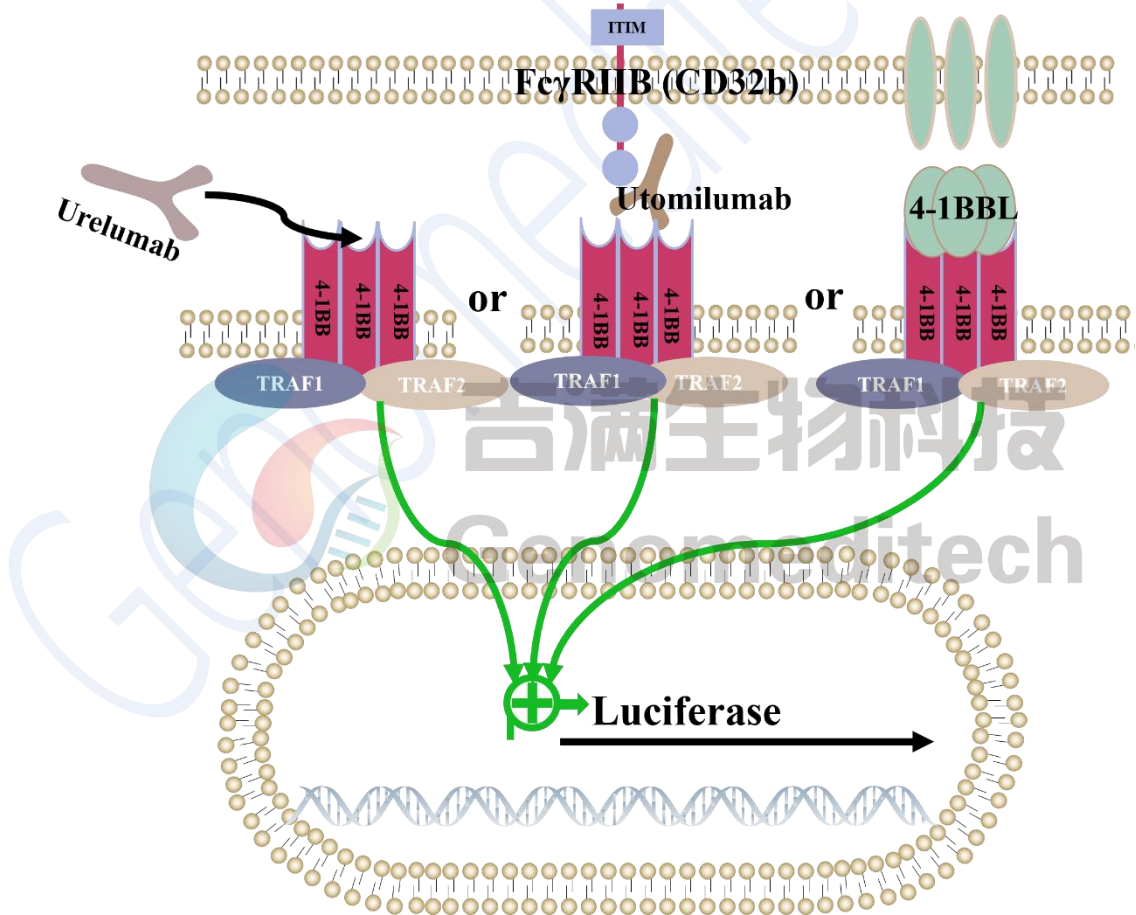


Fig 1.原理示意图

## 四、 材料准备

### 1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	DMEM+10% FBS+1% P.S+4 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin+0.75 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	DMEM+1% FBS+1% P.S

### 2. 试剂耗材准备

#### 试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Blasticidin	10 mg	Genomeditech/GM-040404-1
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
DMEM	500 mL	gibco/C11995500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated	96-well	Corning/3912
Microplate		
Urelumab (anti-TNFRSF9)	/	Aladdin/Ab170654
Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Trimer Protein	100 $\mu\text{g}$	kactus/BBL-HM141
Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab)	/	Genomeditech/GM-26840AB
H_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line	/	Genomeditech/GM-C16925
GMOne-Step 2.0 Luciferase Reporter Gene Assay Kit	1000T	Genomeditech/GM-040513C

#### 重要仪器

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

## 五、 细胞复苏、传代、冻存

### 1. 细胞复苏

注：为确保最高存活率，应在收到冻存细胞后立即解冻并复苏培养。如果在收到细胞后需要继续储存，将其置于液氮罐中，严禁储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ ，因为在 $-70^{\circ}\text{C}$ 下储存会导致活性丧失。

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下轻轻摇动解冻，直到刚刚融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀，176  $\times$  g，离心 3 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞  $\geq 3 \times 10^6$  cells/mL。
- 通过补充复苏培养基的形式，调整活细胞密度到  $2-3 \times 10^5$  cells/mL，根据细胞悬液总体积，将细胞接种到合适的培养皿中。

### 3. 细胞冻存

- 使用 176  $\times$  g，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为  $5 \times 10^6$  cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中， $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

### 2. 细胞传代（以 10 cm 皿为例）

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为上皮细胞，贴壁生长。培养箱中孵育 16-24 h 后，镜下观察细胞贴壁情况，当细胞密度达到 80%，需要进行细胞传代。推荐细胞传代比例为 1:3-1:4，2-3 天传代。注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- 将皿或培养瓶中的培养液弃去，10 cm 皿加 2 mL PBS 润洗 1 次。
- 弃 PBS，加 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 消化液，37 $^{\circ}\text{C}$  消化 30-60 s，显微镜下观察。
- 待细胞变圆，细胞间隙明显，部分细胞刚开始脱离瓶壁时，加 2 mL 左右生长培养基混匀终止消化，将细胞小心吹打下来，176  $\times$  g 室温离心 3 min。

注意事项：

- 细胞刚复苏，死细胞较多，属于正常现象，经调整会有明显好转，状态稳定后，传代后死细胞会变少，细胞生长速度趋于稳定。
- 注意保持密度不超过 80%，否则可能会因细胞受到挤压而导致活性减弱。
- FBS 需 56 $^{\circ}\text{C}$  加热 30 分钟，可灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

## 六、使用方法（示例）

### 1. 激活验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔。本次实验使用 Urelumab (anti-TNFRSF9)（以下简称为 Urelumab）作为阳性抗体，Conc.01 浓度为  $15 \mu\text{g/mL}$ ，3 倍梯度稀释，Conc.01-Conc.10 分别排布在 B2-B11，B12 为 0 浓度对照。周围孔加入  $100 \mu\text{L}$  PBS，以防止边孔蒸发。

孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	Urelumab	15 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1.67 $\mu\text{g/mL}$	555.56 $\text{ng/mL}$	185.19 $\text{ng/mL}$	61.73 $\text{ng/mL}$	20.58 $\text{ng/mL}$	6.86 $\text{ng/mL}$	2.29 $\text{ng/mL}$	762.08 $\text{pg/mL}$	0
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
D												
E												
F												
G												
H												

#### 1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h，将细胞从培养瓶中取出，消化离心收集细胞沉淀，使用适量完全培养基重悬细胞，检测细胞活力并计数，再以完全培养基调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加  $100 \mu\text{L}$  细胞/孔至中间 10 个孔。周围的孔加  $100 \mu\text{L}$  PBS。盖上市盖，于孵箱中孵育过夜使用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测抗体，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

抗体名称	储液	母液	配置方法
Urelumab	10.63 mg/mL	1.063 mg/mL	取 $2 \mu\text{L}$ 储液+ $18 \mu\text{L}$ Assay Buffer

- 96 孔 V 中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入  $180 \mu\text{L}$  Assay Buffer，B3-B12 孔，加入  $120 \mu\text{L}$  Assay Buffer。

- f) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 2.58  $\mu\text{L}$  Urelumab），混匀。

母液吸取		梯度稀释孔，依次从前孔吸取 60 $\mu\text{L}$ ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	2.58 $\mu\text{L}$ Urelumab	加入	180 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- g) 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 60  $\mu\text{L}$ ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 10 个梯度稀释孔（B11）。
- i) 将步骤 a 孵育过夜的孔板取出，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- j) 加入之前准备好的梯度稀释液，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。
- k) 盖上班盖，于 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h。
- l) 使用报告基因检测试剂盒，检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293	0 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	762.08 $\text{pg/mL}$
Cell Line	186474	3407914	164026

### 3) 验证结果

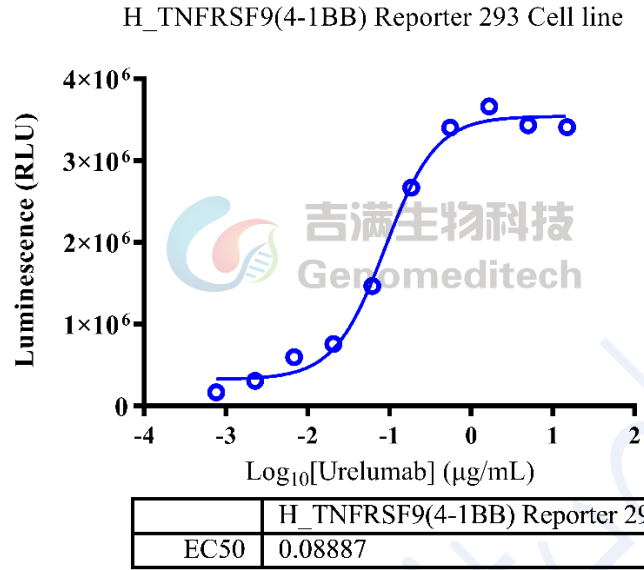


Fig 2. Response to Urelumab. The H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line (Cat. GM-C04832) at a concentration of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Urelumab (anti-TNFRSF9) (Aladdin/Ab170654) in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [18.3].

## 2. 抗体激动剂 Crosslink 验证实验

对于本实验，推荐 H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell Line 细胞量为  $1.5 \times 10^4$  cells/孔, H\_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 细胞量各为  $1 \times 10^4$  cells/孔。Anti-H\_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab) (以下简称为 Utomilumab; 150 kDa) 作为本次实验的抗体, Conc.01 终浓度为 30  $\mu\text{g/mL}$ , 4 倍梯度稀释, Conc.01-Conc.09 分别排布在 B2-B10 及 C2-C10, B11 和 C11 为 0 浓度对照。周围孔加入 100  $\mu\text{L}$  PBS, 以防止边孔蒸发。

孔板排布如下:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	H_FCGR2B CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
C	CHO-K1 Cell Line+Utomilumab	30 $\mu\text{g/mL}$	7.5 $\mu\text{g/mL}$	1.88 $\mu\text{g/mL}$	468.75 ng/mL	117.19 ng/mL	29.3 ng/mL	7.32 ng/mL	1.83 ng/mL	457.76 pg/mL	0	PBS
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

E												
F												
G												
H												

### 1) 加样步骤

- 在实验前 16-24 h, 将靶细胞 H\_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line 和 CHO-K1 Cell Line 从培养瓶中分别消化下来, 以新鲜培养基重悬细胞, 检测细胞活力并计数。离心收集细胞, 再以新鲜培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  cells/mL。以排枪加 100  $\mu$ L 细胞/孔至中间孔 (FCGR2B CHO: B2-B10; CHO: C2-C10)。周围的孔加 100  $\mu$ L PBS。盖上板盖, 于孵箱中孵育过夜。
- 实验前 1-2 h, 从细胞培养瓶中转移 H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line 细胞至 50 mL 离心管中, 计算细胞密度及活力。以 Assay Buffer 重悬细胞, 调整至  $3 \times 10^5$  cells/mL。
- 使用无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 对于待测样品, 分别使用一行 (如 B2-B11、C2-C11)。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Utomilumab	2.327 mg/mL	/	直接使用储液

- 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表。如 B2 孔中加入 71.4  $\mu$ L 的 Assay buffer, B3-B11 加入 55  $\mu$ L 的 Assay buffer。
- 吸取不同体积的待测样品母液, 加入到第一个梯度稀释孔中 (如 B2)。

	母液吸取	梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 18.33 $\mu$ L, 加入次孔										对照孔		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12
A														
B	1.89 $\mu$ L Utomilumab	加入	71.4 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	
C	1.89 $\mu$ L Utomilumab	加入	71.4 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	
D														
E														
F														

G													
H													

- h) 从第一个梯度稀释孔（如 B2）中吸取 18.33  $\mu\text{L}$  液体，加入到第二个梯度稀释孔中（如 B3），充分混匀。
- i) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（如 B10）。
- j) 将步骤 a 孵育过夜的细胞孔板取出，每孔吸弃 100  $\mu\text{L}$  培养基。
- k) 加入步骤 b 准备好的 H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line 细胞 50  $\mu\text{L}$ ， $1.5 \times 10^4$  cells/孔。
- l) 将步骤 i 准备好的抗体梯度稀释液每孔加入 50  $\mu\text{L}$ 。
- m) 盖上检测板盖，于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h。
- n) 使用报告基因检测试剂盒收样检测 Luciferase。

## 2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line+Utomilumab+CHO FCGR2B	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	208585	2177855	224085
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line+Utomilumab+CHO	0 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	457.76 pg/mL
	163264	267823	173001

## 3) 验证结果

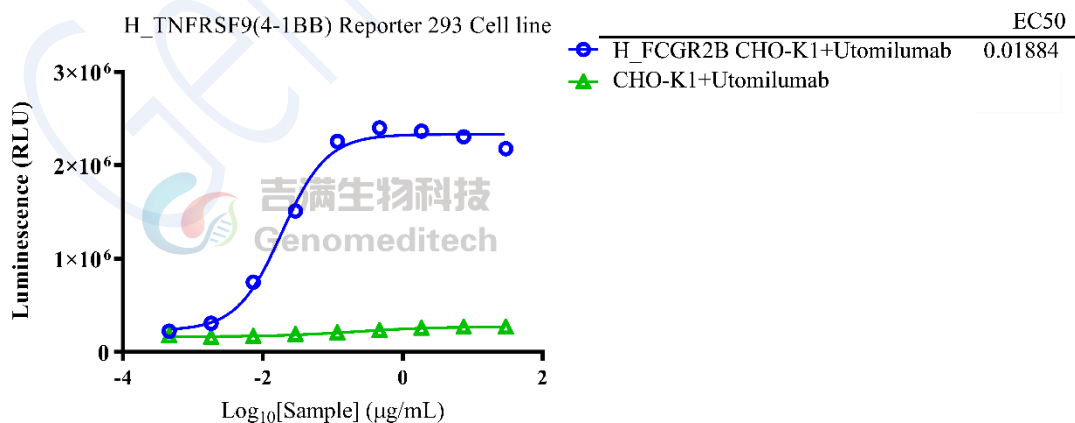


Fig 3. Response to Anti-H<sub>4</sub>-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab). H\_FCGR2B(CD32B) CHO-K1 Cell Line (Cat. GM-C16925) and CHO-K1 Cell Line were seeded at a density of 1E4 cells/well in a 96-well plate and incubated overnight. The next day, serial dilutions of the Anti-H<sub>4</sub>-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab) (Cat. GM-26840AB) were incubated with 1.5E4 cells/well of the H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line (Cat. GM-C04832) in a 96-well plate, and then added to the pre-seeded cells. The mixture was incubated for an additional 6 hours. Firefly

luciferase activity is then measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The results indicated maximum blocking folds of approximately [10.4]. Data are shown by drug mass (top panel) and molar (bottom panel) concentration.

## 附录 1 流式验证结果

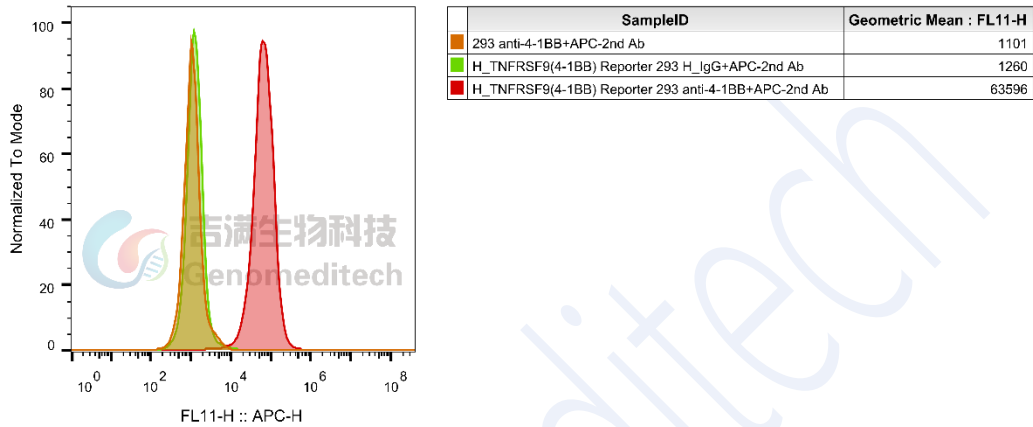


Fig 4. H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line (Cat. GM-C04832) was determined by flow cytometry using Anti-TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Reference Antibody.

## 附录 2 流式稳定性验证结果

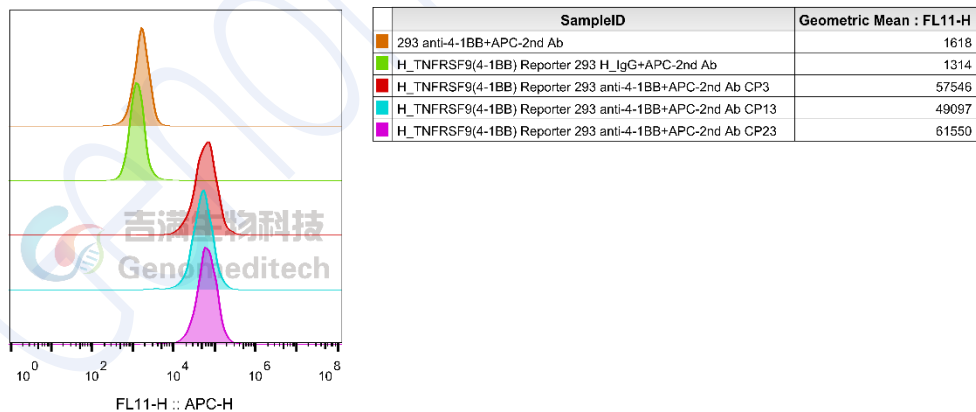


Fig 5. The passage stability of the H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line (Cat. GM-C04832) was determined by flow cytometry using Anti-TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Reference Antibody.

### 附录 3 激活验证

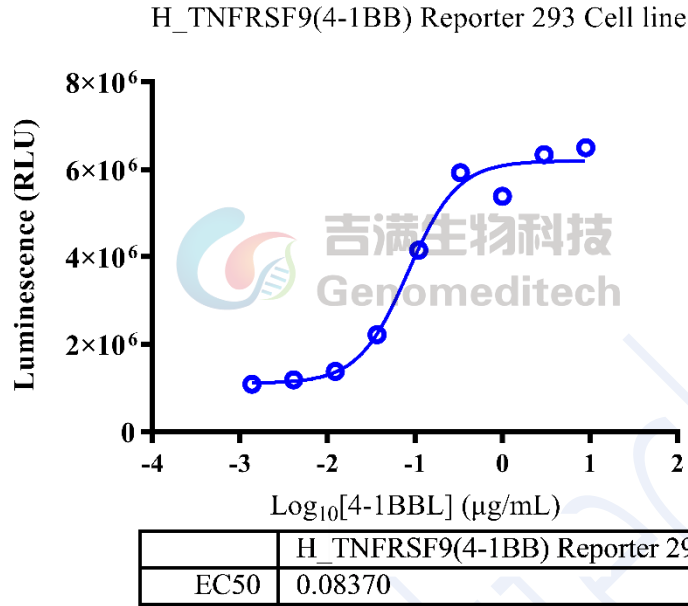


Fig 6. Response to Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Trimer Protein. The H\_TNFRSF9(4-1BB) Reporter 293 Cell line (Cat. GM-C04832) at a density of 1.5E4 cells/well (96-well format) was stimulated with serial dilutions of Human 4-1BB Ligand/TNFSF9 Trimer Protein (kactus/BBL-HM141) in assay buffer (DMEM + 1% FBS + 1% P.S) for 6 hours. The firefly luciferase activity was measured using the Luciferase Reporter Assay Kit (Genomeditech). The maximum induction fold was approximately [6.0]. Data are shown by drug mass concentration.

## 相关产品

4-1BB	
H_TNFRSF9(4-1BB) Reporter Jurkat Cell line	Cynomolgus_TNFRSF9(4-1BB) CHO-K1 Cell Line
H_TNFRSF9(4-1BB) CHO-K1 Cell Line	
Anti-H_4-1BB hIgG2 Antibody(Utomilumab)	Anti-H_TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Antibody(Urelumab)
Anti-TNFRSF9(4-1BB) hIgG4 Reference Antibody (Urelbio)	
CD3	
H_CD3D CD3E KO Jurkat Cell Line	Jurkat CD3-BsAb Reporter Cell Line
Cynomolgus_CD3 HEK-293 Cell Line	Cynomolgus_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line
H_CD3 CHO-K1 Cell Line	H_CD3 HEK-293 Cell Line
H_CD3E(Membrane Bound ECD) CHO-K1 Cell Line	Mouse_CD3 HEK-293 Cell Line
Anti-CD3 epsilon hIgG1 Antibody [OKT-3 (muromonab)]	Anti-CD3 hIgG1 Antibody(CH2527)
Anti-mouse CD3ε mIgG2a Antibody(145-2C11)	

## 使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策:

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。

Genomeditech